©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Über den Einfluß von Salzen auf die Lichtentwicklung von Bakterien

Von

F. Bukatsch

(Mit 6 Textfiguren)

(Vorgelegt in der Sitzung am 10. Dezember 1936)

Fußend auf den grundlegenden Kulturversuchen von H. Molisch (1912), der sich mit Beijerinck wohl die größten Verdienste um unser Wissen von leuchtenden Mikroorganismen erworben hat, gelangte O. Richter (1928) in sehr eingehenden und sorgfältigen Versuchen zu dem Schluß, daß das Natrium für marine Leuchtbakterien ein unbedingt lebenswichtiges Element darstelle: Richter nannte es »Nährnatrium«, um damit besonders zum Ausdruck zu bringen, daß es nicht bloß als Osmotikum wirksam sei. Eine eindeutige Versuchsanstellung gerade bezüglich der Notwendigkeit dieses Elementes ist, wie Richter immer wieder betont, deshalb so schwierig, weil es eben fast überall wenigstens spurenweise vorhanden ist und es daher sehr schwer gelingt, Natrium von der Nährlösung fernzuhalten, zumal dann, wenn es gilt, die notwendige organische Stickstoffquelle zu bieten. Daraus erklären sich die vielen widersprechenden Angaben in der Literatur, deren Aufzählung hier wohl müßig ist, da sie sich in schöner Übersicht in Richter's Arbeit findet. Das vom genannten Autor als Stickstoffquelle verwendete reinste Pepton (Witte) enthielt immer noch mindestens $^1/_{10}\,\%$ NaCl. Richter weist selbst darauf hin und versuchte deshalb — und zwar mit Erfolg — durch Verkleinerung der Peptonmenge den Fehler möglichst herabzudrücken. Erst seinem Schüler A. Mudrak gelang es, sich durch Verwendung von reinen Aminosäuren vom Pepton zu befreien und auf breitester Basis, mit zehn verschiedenen Bakterienstämmen, die Resultate Richter's zu bestätigen. Die etwas vorher veröffentlichten Versuche Fuhrmann's (1932), in denen mit Seefischbrühe und Pepton gearbeitet wurde, erscheinen damit überholt. Gerretsen hatte bereits 1920, allerdings mit geringem Erfolg, Aminosäuren zur Ernährung der Leuchtbakterien herangezogen.

Mudrak (1933) erzielte mit Asparagin, Asparaginsäure und Glykokoll als Ersatz für Pepton gutes Leuchten seiner Kulturen, wenn er nur die freie Säure neutralisierte oder die Konzentration der Aminosäuren entsprechend herabsetzte.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Einleitende eigene Versuche und Methodik.

Gestützt auf die Erfahrungen Mudrak's machten wir uns nun daran, nach anderen geeigneten Stickstoffquellen Umschau zu halten. Verwendet wurden:

Alanin, Arginin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glykokoll, Kreatin, Leuzin, Serin, Tyrosin und Valin in Konzentrationen von je 0·05 und 0·01%.

Außerdem erhielt zunächst die Nährlösung nur 3% Kochsalz, 1% Glycerin und wurde mit Natronlauge neutralisiert. Die je 50 cm^3 dieser Nährlösung enthaltenden Erlenmeyer-Kolben wurden am 22. II. 1936 folgendermaßen beimpft:

Eine 24 Stunden alte Kultur mariner Leuchtbakterien[1] in Lösung von 3% NaCl, ½% Glycerin und 1% Pepton, wurde 1:20 verdünnt und je $^1/_{10}$ cm^3 davon jedem Kölbchen zugesetzt (es kamen auf diese Weise 0·05 *mg* Pepton aus der Impfflüssigkeit in die Nährlösung, was kaum ins Gewicht fällt). Nach einer Woche war von Leuchten keine Spur zu beobachten. Es wurden nun die übrigen Komponenten der von Richter angegebenen Nährlösung [je 0·02% $Ca(NO_3)_2$, $MgSO_4$, K_2HPO_4, Spur $FeSO_4$] zugefügt und nach Sterilisation in der geschilderten Art am 3. März neuerlich beimpft.

Schon nach 2 Tagen zeigte der Kolben mit 0·05% Glutaminsäure prächtiges Leuchten, 0·05% Asparaginsäure und Leuzin etwas schwächeres. Am vierten Tag nach der Neuimpfung erfolgte die hier wiedergegebene Aufnahme der hellst leuchtenden Kölbchen (Fig. 1) (nach einer Stunde Exposition im Dunkeln wurde kurz elektrisch beleuchtet, um die Umrisse der Kolben und die Aufschriften sichtbar zu machen; die Kolben enthalten von links nach rechts: 0·05% Glutaminsäure, 0·05% Serin, 0·01% Serin, 0·05% Leuzin, 0·01% Alanin und 0·05% Asparaginsäure). (Glykokoll 0·05% und Valin 0·01% leuchteten schwach.)

2 Tage später wurde die relative Leuchtintensität, die sich inzwischen bei den einzelnen Kulturen verändert hatte, bestimmt; davon soll weiter unten die Rede sein. Mit Ende der zweiten Woche wurde die Versuchsreihe abgebrochen. Das Gesamtergebnis war:

a) außer den von Mudrak angegebenen Aminosäuren (Asparaginsäure und Glykokoll) konnte noch eine Reihe anderer festgestellt werden, die zum Teil noch wesentlich stärkeres Leuchten ermöglichen, ganz besonders Glutaminsäure (0·05%), in deren Lösung noch höhere Leuchtwerte erzielt wurden, als in der zur Kontrolle angesetzten gleichbehandelten 1%-Peptonlösung. Ferner gaben gute Lichtentwicklung: Serin (0·05%, 0·01%), Leuzin (0·05% und 0·01%) und Alanin, diese drei Stoffe bewirken lang dauerndes intensives Leuchten der Kulturen, letztgenannter Stoff aber nur in der Konzentration von 0·01%. Arginin 0·05% und Valin 0·01%

[1] Die Bakterien wurden von einem frischen Hering im Dezember 1935 abgezüchtet und in Reinkultur weitergezogen.

ergaben nur schwaches Leuchten. Zu dem schon von Mudrak als hemmend angeführten Tyrosin kommt nach unseren Erfahrungen noch das Kreatin.

b) Wie eigentlich zu erwarten, entwickelten sich die Bakterien in einer neben Kohlehydrat und Aminosäure nur NaCl enthaltenden Nährlösung nicht. Es ist zu ihrem Gedeihen die Richter'sche Nährlösung notwendig.[1] Ob nun alle Kationen derselben außer Na wirklich notwendig sind, war bislang noch nicht untersucht und sollte in der folgenden Versuchsreihe aufgeklärt werden. Wenn auch die Notwendigkeit von Sulfat und Phosphat zum Aufbau der Eiweißkörper der Bakterien feststand, war die Notwendigkeit der einzelnen Kationen nicht so sicher: man denke nur an die Feststellungen

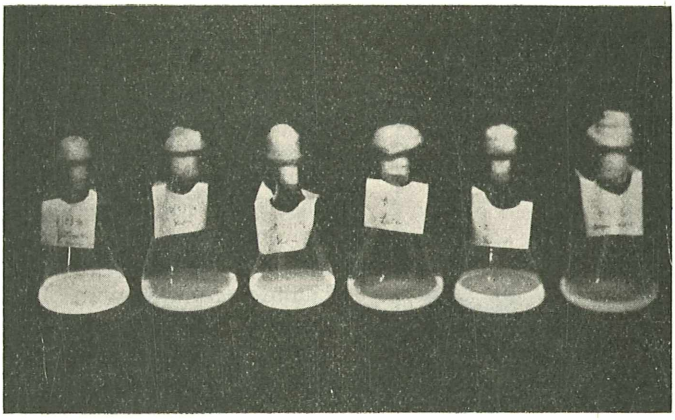

Fig. 1

Molisch' bei seinen Ernährungsversuchen niedriger Pflanzen (1895, 1896), wo sich z. B. das Calcium als für bestimmte Algen und Pilze überflüssig erwies. Bevor wir aber auf unsere Versuche näher eingehen, sei kurz die Methodik der Helligkeitsbestimmung des von den Bakterien ausgestrahlten Lichtes beschrieben.

Da das von den Leuchtbakterien entwickelte Licht im Vergleich zu den sonst im praktischen Leben vorkommenden Lichtstärken als sehr gering bezeichnet werden muß, war es naturgemäß schwer, ein geeignetes Photometer dafür zu finden. Zunächst wurden Versuche mit einer Lange'schen Sperrschicht-Selen-Photozelle, gekoppelt mit einem tragbaren Galvanometer, dessen Ausschläge in »Lux« geeicht waren, durchgeführt. Obwohl dieser Apparat zur Bestimmung der Helligkeit auch in relativ düsteren Räumen und größeren Wasser-

[1] In Nährlösung: Natriumchlorid, Glycerin und Pepton, gediehen die Bakterien gut, offenbar genügten die Verunreinigungen des Peptons durch Salze; allerdings gab auch hier der Zusatz der Komponenten der Richter'schen Nährlösung Steigerung der Lichtentwicklung.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

tiefen sich geeignet erwies, war er für unsere Zwecke zu unempfindlich. Eine Messungseinrichtung mit Alkaliphotozelle stand uns leider nicht zur Verfügung.

So wurde zunächst auf die Ermittlung von Absolutwerten verzichtet und nach einer Möglichkeit gesucht, auf subjektivem Weg die verschiedenen Helligkeiten der Kulturen wenigstens zu vergleichen. Eine für Vergleichsmessungen recht befriedigende Lösung wurde mit der folgenden Anordnung erzielt (vgl. Fig. 2):

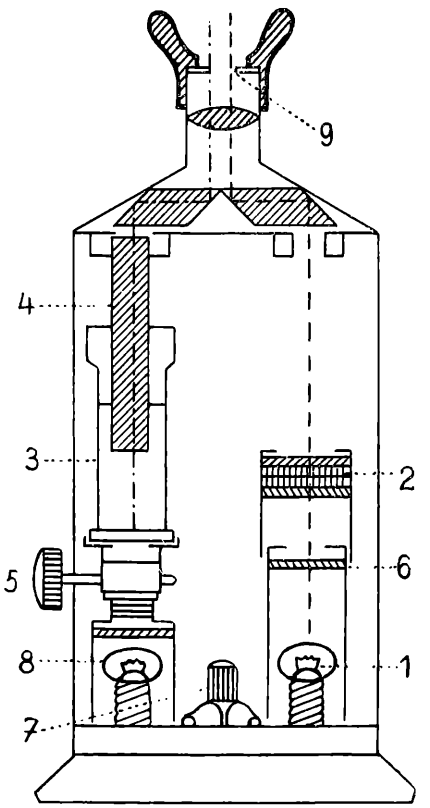

Fig. 2.

Von einem Kolorimeter (System Dubosque) der Firma Hellige, Freiburg i. B., wurde der eine Tauchstift samt dazugehöriger Küvette entfernt und an deren Stelle eine Vergleichsquelle von ähnlich schwachem mattgrünem Licht wie das Bakterienlicht gebracht. (Gekapselte 4-*V*-Lampe 1, von einem Akkumulator gespeist; so viele Opalgläser sowie Blau- und Grüngläser als Filter vorgeschaltet 2, bis empirisch die richtige Farbe und eine geeignete Intensität des Lichtes gefunden war.) Die zweite Küvette 3 wurde mit der leuchtenden Bakteriensuspension gefüllt. In diese ragt starr, mit dem Oberteil des Kolorimeters verbunden, der Tauchstift 4. Nun wurde mit Hilfe des Zahntriebes 5 die Küvette so lange gehoben oder gesenkt, bis eben jene Schichtdicke der leuchtenden Flüssigkeit gefunden war, die der einen Gesichtsfeldhälfte des Okulars dieselbe Helligkeit erteilte, wie die Vergleichslampe der anderen Hälfte, was am optischen Verschmelzen der beiden Teile des Gesichtsfeldes zu erkennen war. Infolge der geringen Helligkeiten konnte die Einstellung nur mit gut ausgeruhtem dunkeladaptiertem Auge durchgeführt werden; die Lochblende 9 des Okulars wurde durch eine mit größerer Öffnung ersetzt. Die Ablesung des Küvettenstandes (Schichtdicke) am seitlich angebrachten Maßstab mit Noniusteilung erfolgte in sehr gedämpftem Licht einer Taschenlampe. Alle Manipulationen wurden in der photographischen Dunkelkammer bei rubinrotem Licht ausgeführt.

Nach vollführter Messung wurde der die Filter 2 enthaltende Aufsatz des Lämpchengehäuses abgehoben, so daß nunmehr das

Licht nur durch die gelblich gefärbte Mattscheibe 6 durchstrahlte; außerdem wurde am Schalter 7 auch das zweite, unter der Küvette befindliche 4-*V*-Lämpchen 8 eingeschaltet. So wurde die Bakteriensuspension durchleuchtet und nun wiederum die Einstellung der Küvette so lange verändert, bis wieder in beiden Gesichtsfeldhälften gleiche Helligkeit herrschte (»Trübungsmessung«).

Diese beiden Bestimmungen ergaben zweierlei:

1. konnte, ausgehend von dem Satz: »Je geringer die Leuchtstärke, desto größer die Schichtdicke für gleiche Helligkeit u. u.«, die relative Leuchtkraft der Kulturen festgestellt werden;

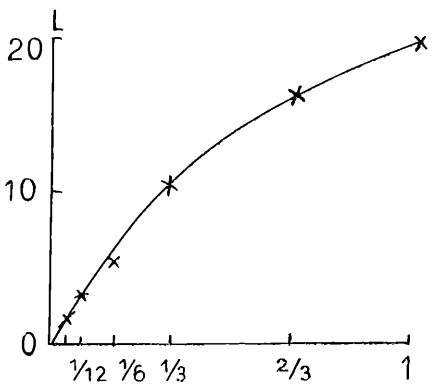

Fig.

2. wurde mit Hilfe der Trübungsmessung der Kulturen ein vergleichsweiser Anhaltspunkt für die Keimzahlen der Suspension gewonnen.

Zur Ermittlung der »relativen Leuchtkraft« (L) wurde die größte mit dem Apparat erzielbare Schichtdicke (40 *mm*) durch die zur Helligkeitsgleichheit notwendige jeweilige Schichtdicke (N) in Millimetern dividiert:

$$L = \frac{40}{N}.$$

Um von der Eignung dieser Methode ein Bild zu erhalten, wurde an einer willkürlich herausgegriffenen Kochsalzpeptonkultur eine Eichkurve hergestellt, wobei die Voraussetzung gemacht wurde, daß proportional der Verdünnung mit 3% Kochsalzlösung auch die Leuchtkraft sinke. (Dies gilt jedoch nur für junge Kulturen, da, wie sich herausstellte, in älteren, bei Verdünnung infolge der günstig auf die Bakterien wirkenden Verdünnung der Stoffwechselprodukte die Leuchtkraft nicht im gleichen Maß, sondern viel weniger stark sinkt.) Tabelle 1 und Fig. 3 geben die Meßergebnisse wieder.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Tabelle 1.

Verdünnung	N	L
Unverdünnt	2·00 *mm*	20·0
Auf $^2/_3$	2·5 *mm*	16·0
$^1/_3$	3·8 *mm*	10·5
$^1/_6$	8·0 *mm*	5·0
$^1/_{12}$.	12·5 *mm*	3·2
$^1/_{24}$.	22·1 *mm*	1·8

Es seien nun gleich die eingangs erwähnten Messungen der relativen Leuchtkraft von Kulturen in den verschiedenen Aminosäuren angeführt.

Messung am 9. März 1936:

	Relative Leuchtkraft
1% Peptonlösung (Kontrollösung)	33·4
0·05% Glutaminsäure	40·0
0·01% Alanin	28·5
0·05% Leuzin	21·0
0·01%	6·5
0·05% Asparaginsäure	6·3
0·01%	unter 1
0·05% Serin	3·8
0·01%	7·9

Da die Messungen zur Errechnung eines Mittelwertes jeweils doppelt ausgeführt wurden und bei einiger Sorgfalt doch einige Zeit erforderten, mußte zwischendurch die Küvette mehrmals rasch gehoben und gesenkt werden, um durch Durchmischen des Inhaltes einem Absinken der Helligkeit infolge Sauerstoffmangels vorzubeugen. Aus Gründen der Zeitökonomie wurden die Bestimmungen nur in bestimmten Zeitabständen ausgeführt. In den meisten Fällen wurde die Helligkeit der einzelnen Kulturen untereinander verglichen und subjektiv geschätzt, es finden sich dann in den Protokollen folgende Helligkeitsangaben: + + sehr hell, + gut leuchtend, + — schwach leuchtend, — nicht leuchtend.

Hauptversuche.

1. Prüfung der Notwendigkeit der einzelnen Kationen der Richterschen Nährlösung.
2. Wirkung (kleiner Mengen) anderer Metalle.

   Rolle des Calciums im Verhältnis zu anderen Metallen; seine Ersetzbarkeit durch Strontium und Barium.

1. Prüfung der Notwendigkeit der einzelnen Kationen in der Richter'schen Nährlösung.

Gestützt auf die Erfahrungen der Vorversuche, in denen sich als definierte, praktisch von Metallsalzen freie organische Stickstoffquelle 0·05% Glutaminsäure als besonders günstig erwies, wurde

diese den Nährlösungen an Stelle von Pepton zugefügt. An Salzen wurden nach Möglichkeit Merck's Präparate »zur Analyse« verwendet, in Fällen, wo dies nicht möglich war, Erzeugnisse der österreichischen Heilmittelstelle mit der Angabe »purissimum«. Als Versuchsgefäße dienten schon längere Zeit verwendete, mit Säure ausgekochte, sorgfältig gereinigte Erlenmeyer-Kolben aus Jenaer Glas (das nach vorliegender Analyse von Ost nur Ba, Zn und Al an Metallen enthalten soll). Die Neutralisation der Aminosäure erfolgt in der Regel mit NaOH, in natriumfreien Kulturen mit KOH.

Diese letztgenannten Versuche über die Ersatzbarkeit des Natriums durch andere Alkalien, beziehungsweise Erdalkalien wurden nur zur Orientierung durchgeführt und führten durchwegs zur Bestätigung der Ergebnisse Richter's und Mudrak's bezüglich der Unersetzlichkeit des Na. Es erübrigt sich hier wohl näher darauf einzugehen, da diese Versuche schließlich nur eine Wiederholung bedeuten; erwähnt sei bloß, daß unter den verschiedenen geprüften Na-Salzen auch in 3% $NaBrO_3$ mäßiges, am dritten Tag allmählich erlöschendes Leuchten beobachtet werden konnte. Ich betone dies deshalb, weil Mudrak hervorhebt, daß in Gegenwart von $NaBrO_3$ niemals Entwicklung beobachtet werden konnte. Eine Förderung des Tiefenleuchtens durch $NaNO_3$ in unseren Flüssigkeitskulturen konnte nicht beobachtet werden, da kurze Zeit nach dem Schütteln sich die Zone größerer Helligkeit immer mehr nach der Oberfläche zusammenzog, rascher als beispielsweise in $Na_2S_2O_3$. Dabei fand aber doch eine Reduktion des Nitrats zu Nitrit durch die Bakterien statt, da die Kulturen nachträglich mit dem Gries-Ilosvay'schen Reagenz Rotfärbung ergaben, was nicht auf eine Zerlegung und Oxydation von Peptonbestandteilen zurückzuführen ist, weil in peptonhaltigen NaCl-Kulturen diese Rotfärbung nie erhalten werden konnte.

Zur Untersuchung über die Notwendigkeit von K, Ca, Mg und Fe wurden neben der zur Kontrolle hergestellten vollständigen Nährlösung (2·5% NaCl, 0·5% Glycerin, 0·05% Glutaminsäure, je 0·02% Ca-Nitrat, sec. K-Phosphat, Magnesiumsulfat und eine Spur Eisensulfat) zwei verschiedene Kölbchenreihen aufgestellt:

1. solche, welche die komplette Nährlösung mit Ausnahme des gerade zu untersuchenden Metallsalzes enthielten; damit aber das

Tabelle 2.

(Beimpft am 25. III., abends.)

Datum	Kontrolle		Calcium		Kalium		Magnesium		Eisen	
	1	2	nur	ohne	nur	ohne	nur	ohne	nur	ohne
27. III.	+-	+		+-+	+—	—	—	+-—	—	+-—
28. III.	+	+	—	+-+	+—		—	+-—		+-—
30. III.	+-+	+-+		+-+	+-			+-	—	+-—
31. III.	+-	+-		+-	+-	—		+-		+-—
2. IV.	+-	+-		+-	+-			+-	—	+-

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Anion nicht ebenfalls fehle, wurde die gleiche Menge des entsprechenden Natriumsalzes zugefügt;

2. solche, welche außer NaCl, Aminosäure und Glycerin nur eben das in Reihe 1 ausgelassene Salz enthielten; die fehlenden Anionen wurden wieder durch die entsprechenden Na-Salze ersetzt. Die Ergebnisse seien in der Tabelle 2 zusammengestellt.

Das Ergebnis des Versuches (Tabelle 2) läßt sich etwa folgendermaßen deuten:

Ohne Kalium erfolgt keine Entwicklung; in der neben Na bloß K enthaltenden Nährlösung tritt immerhin schwaches, andauerndes Leuchten auf. Dies alles spricht für die unbedingte Notwendigkeit des Kaliums. (In der neben Na nur Fe, Mg oder Ca enthaltenden Nährlösungen konnte keinerlei Entwicklung festgestellt werden.) Das Fehlen des Eisens läßt nur sehr spärliche Entwicklung zu, was die Bedeutung dieses Elementes erkennen läßt, dessen Bedeutung als Vermittler der Oxydation bei Atmungsvorgängen von Warburg dargetan wurde.

In magnesiumfreier Nährlösung stellt sich allmählich recht deutliches Leuchten ein, so daß daraus geschlossen werden kann, daß diesem Element für die von uns untersuchten Organismen nicht dieselbe Wichtigkeit zukommt wie den vorerwähnten Elementen.

Trotz Fehlen von Calcium war die Entwicklung und das Leuchten von Anfang an ausgezeichnet; das Calcium erscheint demnach ohne weiteres entbehrlich in der Nährlösung, was schon Molisch in seinen klassischen Untersuchungen über die Ernährung von Bakterien und niederen Pilzen festgestellt hat. Unter besonderen Bedingungen kann aber dem Ca eine sehr wichtige Rolle zukommen, wie in Absatz 3 gezeigt werden wird.

2. Wirkung von Schwermetall-, Zn- und Al-Salzen.

Wenn wir die Literatur überprüfen, finden wir zahlreiche Angaben über die Giftwirkung schon geringer Mengen von Schwermetallsalzen auf Mikroben; anderseits finden sich Angaben, daß kleinste Mengen solcher »giftiger« Stoffe starke Entwicklungsförderung hervorbringen können. Die neueren Arbeiten auf diesem Gebiet sind von Pirschle in den »Fortschritten der Botanik«, 1933 ff., zusammengestellt worden; von älteren Autoren seien erwähnt: Raulin, Förderung von *Aspergillus* (1869); Ono, $CuSO_4$- und $HgCl_2$-Wirkung auf Pilze (1900); Bertrand, Wirkung von Mn-Salzen (1911).

Es bedeutet dies nichts anderes als die Auswirkung des bekannten physiologischen Gesetzes von der Reizwirkung sonst schädlicher Einflüsse in kleinsten Mengen (Gifte, Strahlung usw.).

Zunächst machten wir in Petrischalen mit Dichtsaaten auf Fisch-Kochsalz-Pepton-Gelatine einige Orientierungsversuche unter Verwendung der Beijerinck'schen »Auxanogrammethode« Zu diesem Zweck wurden kleine Stückchen chemisch reiner Metalle, nachdem sie durch die Flammen gezogen und abgekühlt waren, auf die gleich-

mäßig mit leuchtenden Kolonien besäte Gelatinoberfläche gelegt. Gleichzeitig wurden genau gewogene Stücke derselben Metalle in flüssige, sterile und beimpfte Nährlösung gebracht und nach 6 Tagen der Gewichtsverlust bestimmt, um so Anhaltspunkte für die Löslichkeit der Metalle im Substrat zu erhalten. Es wurden zunächst einige Metalle verwendet, für die in der Literatur stimulierender Einfluß angegeben war. Interessant waren die Ergebnisse mit Zn und Cu: Einen Tag nach Auflegen der Metallstücke ergab sich das in Fig. 4 wiedergegebene Bild.

Um die beiden Zinkstücke (links, untereinander) war ein breiter, nicht mehr leuchtender Hof entstanden, während ein solcher

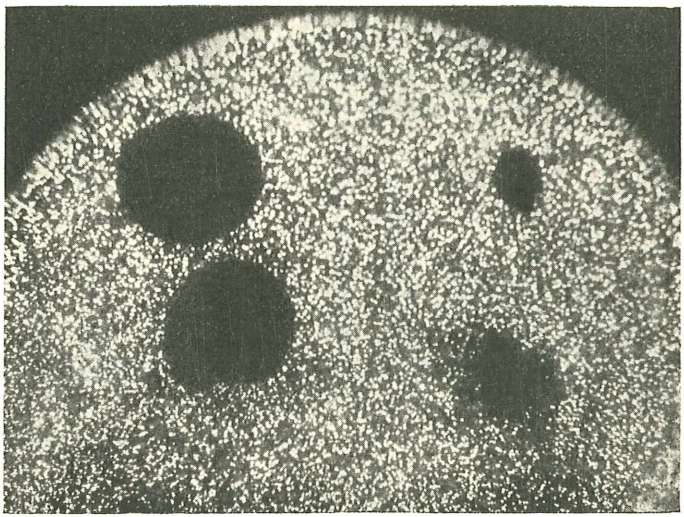

Fig. 4.

um die rechts liegenden Kupferstücke nur ganz klein war. Aus den Gewichtsverlustbestimmungen ergab sich aber die Löslichkeit des Cu in Nährlösung größer als die des Zn! Es mußte demnach das Zink weit giftiger auf unsere Bakterien wirken als das Cu. (Zur Begegnung des Einwandes, daß es sich bei der Hofbildung um das Zink um ein elektrolytisches Phänomen handeln könne, da Cu und Zn auf ein und derselben Platte Anlaß zu elektrischen Strömen geben können, wurden Kupfer- und Zinkstücke in verschiedenen Petrischalen aufgelegt. Das Ergebnis blieb das gleiche. Fe und Al gaben zu geringer Hofbildung Anlaß, Blei kaum merklich, was wohl mit seiner schweren Löslichkeit zusammenhängt.) Um die Angelegenheit zu klären, wurde nun der normalen Nährlösung (hier verwendeten wir 3% NaCl, ½% Glycerin und 1% Pepton) abgestufte Mengen der verschiedenen, zu untersuchenden Metalle in Form der Sulfate geboten, um die Schwellenkonzentration für die Entwicklung festzustellen.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

In der ersten derartigen Reihe wurden je 0·01, 0·001 und 0·0001% folgender Salze der Nährlösung zugesetzt: Kupfersulfat, Zinksulfat, Ferrosulfat, Manganosulfat und Aluminiumsulfat.

Zwei der drei Kölbchen der Kontrolle wurden mit 0·01 und 0·001% Na_2SO_4 versetzt, eines blieb ohne jeden Zusatz zur Nährlösung. Da sich herausstellte, daß die geringen Na_2SO_4-Gaben auf die Lichtentwicklung kaum einen Einfluß ausübten, blieb der Zusatz bei den Kontrollkölbchen der folgenden Versuche weg. Das P_H der Nährlösung wurde in allen Kölbchen auf 7·5 eingestellt.

Die Beimpfung erfolgte in gewohnter Weise am 4. März abends. Die Ergebnisse sind aus der folgenden Tabelle zu entnehmen:

Tabelle 3.

(Der Kürze halber sind immer nur die Metalle genannt, es ist also jeweils »Sulfat« zu ergänzen.)

Datum	Kontrolle			Cu			Zn		
				0·01	0·001	0·0001	0·01	0·001	0·0001
	1	2	3	Prozent					
5. III.	+—	+	+—	+—	+	+		+	+
6. III.	++	++	+	+	+	++	—	++	++
7. III.	++	++	+	+	+[1]	++	—	+	++
9. III.	++	++	++	+		++	—	++	++
10. III.	++	++	++	+		++		++	++
11. III.	++	++	++	+		++		++	++
14. III.	++	++	++	+		++		++	++

Datum	Kontrolle			Fe			Mn			Al		
				0·01	0·001	0·0001	0·01	0·001	0·0001	0·01	0·001	0·0001
	1	2	3	Prozent								
5. III.	+—	+	+—	+	+	—	—	—	+			—
6. III.	++	++	+	+	++	+—	—		+—	—	—	+
7. III.	++	++	+	++	++	+		—	+	—	—	+
9. III.	++	++	++	+	+	++		+—	+	—	—	++
10. III.	++	++	++	+	+	++		++	+			++
11. III.	++	++	++	+	+	++	—	++	+	—	—	++
14. III.	++	++	++	+	+—	+	—	++	+—	—	—	++

[1] Kulturkölbchen gebrochen.

Schon bei flüchtiger Betrachtung fällt auf, daß unsere Bakterien den einzelnen Salzen gegenüber recht verschieden empfindlich sind: Während Fe und Cu auch in der höchsten hier angewandten Konzentration (0·01%) vertragen werden, ohne daß das Leuchten eine beträchtliche Schwächung erfährt, wird 0·01% Zn absolut hemmend, erweist sich also tatsächlich giftiger als Cu. Noch giftiger scheint Mangan zu sein, da hier die Entwicklung auch erst bei

0·001%, aber viel langsamer einsetzt, so daß erst nach 4 Tagen Leuchten auftritt. Das Aluminium endlich gestattete nur bei 0·0001% Entwicklung.

Am 6. März wurde die relative Leuchtkraft der Kulturen und ihre Dichte bestimmt. In Fig. 5 wird das Ergebnis graphisch veranschaulicht.

Zunächst fällt auf, daß bestimmte Zusätze eine ausgesprochene Förderung der Lichtentwicklung ergeben (0·0001 Cu, 0·001 Zn, 0·0001 Zn, 0·001 Fe). Diese Steigerung des Leuchtens war bei Zn so deutlich, daß sie rein schätzungsmäßig mit dem Auge gut feststellbar war.

Die Frage, ob die erhöhte Lichtentwicklung durch stärkere Entwicklung (höhere Keimzahl) bedingt sei, erledigt sich bei Betrachtung der jeweils rechts an die Kolonnen, welche die Leuchtkraft versinnbildlichen, angeschlossenen Darstellungen der relativen

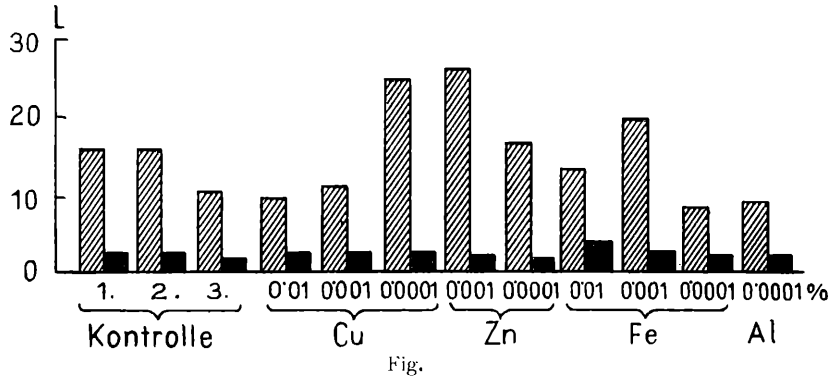

Fig.

Dichte (schwarze Rechtecke); die besonders stark leuchtenden Kulturen weisen eine ähnliche Dichte wie die erste Kontrolle auf, die sogar wesentlich geringer ist als die der verhältnismäßig schwächer leuchtenden Kultur mit 0·01 Fe.

Somit ergibt sich, daß ähnlich der stimulierenden Wirkung geringer Schwermetallsalzgaben, wie sie für andere niedrige Lebewesen wiederholt beschrieben wurden, auch unsere Leuchtbakterien in ihrer Lichtentwicklung durch kleine Dosen bestimmter (ganz besonders Zn-) Salze deutlich gefördert werden. Die Förderung erstreckt sich aber nicht auf das Wachstum als solches, so daß wir es nicht mit einer allgemeinen Stimulation zu tun haben, sondern mit einer Förderung, welche die Lichtproduktion der Einzelindividuen betrifft.

Die Wiederholung der Versuchsreihe führte zu ganz ähnlichen Ergebnissen. Auffallend war die große Toleranz gegenüber dem in der Regel für Mikroorganismen als sehr giftig bekannten Cu. Um die Schwelle für Kupfer festzuhalten, wurden Versuche mit Zusätzen von 0·02, 0·03 und 0·04% $CuSO_4$ angestellt. Die Lösung

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

mit 0·02% ergab noch gutes Leuchten, während bei höherer Konzentration keine Entwicklung mehr erfolgte; die Erträglichkeitsgrenze für Cu liegt also etwas über 0·02% $CuSO_4$. Auch Ag und Cd wurden auf ihren Einfluß untersucht; wegen der mit Ag bei Anwesenheit von Cl-Ionen zu gewärtigenden Fällung wurde das NaCl durch isosmotische Mengen $NaNO_3$ ersetzt. Für beide Metalle liegt die Erträglichkeitsgrenze über 0·001%, da diese Menge nicht nur deutlich Entwicklung, sondern auch schwache Förderung ergab, 0·01% jedoch vollständig hemmend wirkte.

Mitunter wurden auch in nicht leuchtenden Kulturgefäßen Trübungen beobachtet, einige Tropfen davon in frische normale Nährlösung gebracht, ergaben aber niemals Leuchten.

3. Über die Wirkung der Anwesenheit von Calcium.

Eine der Versuchsreihen, wie sie im vorhergehenden Kapitel beschrieben wurden, erfuhr insoferne eine Erweiterung, als die Salze nicht bloß gewöhnlicher Nährlösung (mit 2·5% NaCl), sondern auch in einer Parallelreihe einer solchen zugesetzt wurden, in welcher ein Teil des NaCl durch $CaCl_2$ isosmotisch ersetzt war (1·5% NaCl + 1·9% $CaCl_2$).

Die NaCl-Nährlösung ergab, wie aus den beiden letzten Tabellen ersichtlich, Resultate, die ganz den Erfahrungen der vorhergehenden Versuche entsprachen: 0·01% Zn und Mn sowie 0·001% Al hemmten die Entwicklung vollständig, während Zn 0·001 und Cu 0·002 wieder deutliche Stimulation erkennen ließen. (Hervorgehobene Werte der Tabelle 5.) Vergleichen wir damit das Ergebnis in der $CaCl_2$-haltigen Nährlösung, finden wir ein deutlich abweichendes Verhalten:

Zunächst können wir auch bei jenen Zusätzen, die infolge ihrer Konzentration in gewöhnlicher Nährlösung vollständig die Bakterienentwicklung unterdrücken, deutliches Leuchten und somit auch Entwicklung beobachten. Ferner sehen wir in der calciumhaltigen Nährlösung sonst so auffallende Stimulationen, wie z. B. bei 0·001% Zn-Zusatz, nicht mehr auftreten, dafür andere nicht beobachtete (z. B. bei Zusatz von 0·001 Mn).

Besonders bemerkenswert erscheint uns aber die erste Feststellung, daß nämlich die Anwesenheit von Ca die schädliche Wirkung zu hoher Schwermetallsalz-Konzentrationen aufzuheben vermag. Diese »antagonistische« Wirkung des Calciums gegenüber Schwermetallen, aber auch gegenüber vorherrschender Wirkung eines Alkalimetalles, wie z. B. K, wurde schon mehrfach, u. a. auch an Wurzeln höherer Pflanzen, festgestellt.

Wenn wir in den folgenden Zeilen eine Deutung dieser Erscheinung versuchen, sind wir uns der Unsicherheit und Unvollständigkeit unseres Unterfanges wohl bewußt.

Zunächst ist wohl anzunehmen, daß das Lebensgeschehen in der Zelle nur so lange ungestört ablaufen kann, als sich die Plasmakolloide und die durch die Oberflächenspannungsverhältnisse

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Tabelle 4 (beimpft am 12. III. mittags).

Datum	Nur 2·5% NaCl								1·5% NaCl + 1·9% $CaCl_2$							
	Kontr. ohne Zusatz	Cu 0·02	Cu 0·002	Zn 0·01	Zn 0·001	Mn 0·01	Mn 0·001	Al 0·001	Kontr. ohne Zusatz	Cu 0·02	Cu 0·002	Zn 0·01	Zn 0·001	Mn 0·01	Mn 0·001	Al 0·001
	Prozent								Prozent							
13. III.	+	—	+—	—	+—	—	—	—	+	+—	++	+—	++	—	—	—
14. III.	++		+		+	—	—	—	++	+—	++	+	++	—	—	—
16. III.	++	+—	++	—	++	—	+	—	++	+	++	+	++	+—	++	+—
17. III.	++	+—	++	—	++	—	++	—	++	+—	++	+	++	+—	++	++
18. III.	++	++	++	—	++	—	++	—	++	+—	++	+	++	+—	++	++
19. III.	++	++	++	—	++	—	++	—	++	+—	++	+	+	—	++	++
20. III.	++	++	++	—	+	—	+	—	+	+—	+	+—	+	—	+	+

In Abständen von 2 Tagen wurden die relativen Leuchtstärken und Dichten der Kulturen bestimmt:

Tabelle 5.

Datum	Nur 2·5% NaCl								1·5% NaCl + 1·9% $CaCl_2$							
	Kontr. ohne Zusatz	Cu 0·02	Cu 0·002	Zn 0·01	Zn 0·001	Mn 0·01	Mn 0·001	Al 0·001	Kontr. ohne Zusatz	Cu 0·02	Cu 0·002	Zn 0·01	Zn 0·001	Mn 0·01	Mn 0·001	Al 0·001
	Prozent								Prozent							
14. III.	20 (4)		3·6 (2)		7·7 (5)				21 (2)	0·9 (2)	**23·5** (4)	2·2 (2·5)	11·1 (3)			
16. III.	40 (20)	< 1 (1)	**50** (10)		**57** (20)		4·0 (3)		33·2 (10)	11·4 (6)	**40** (13)	10·2 (10)	14·3 (20)	< 1	**50** (20)	2·0 (2)
18. III.	33·2 (20)	11·4 (20)	22·2 (20)		20 (20)		18·2 (7)		20 (12)	< 1	13·3 (10)	4·4 (20)	7·7 (20)	< 1 (8)	15·4 (15)	**33·2** (7)
20. III.	20 (10)	20 (7)	17·4 (7)		8·3 (5)		8·9 (7)		5·5 (20)	< 1 (4)	8·0 (20)	< 1 (20)	2·1 (20)		8·0 (10)	5·9 (10)

Die Zahlen in Klammern bedeuten ungefähre Angaben der Dichte.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

derselben bedingten Grenzschichten in intaktem physiko-chemischem »Normalzustand« bezüglich Dispersität, elektrischer Teilchenladung usw. befinden. Wie leicht dieses heikle Gleichgewicht zu stören ist, zeigen die vielen Versuche über den Ioneneinfluß der umspülenden Lösung auf die Entwicklung der Eier von Seetieren (Seeigeln, [Loeb u. a.], Fischen [Mathews], Krebsen usw.). So wirken sonst lebenswichtige Kationen wie Kalium, Natrium, für sich allein direkt giftig, da sie die Quellung der Plasmakolloide zu sehr erhöhen, wenn nicht durch Zusatz der entquellend, also antagonistisch wirkenden Erkalkalionen, wie Ca, Mg, der Schaden behoben wird. So verwendet man für feine physiologische Versuche seit langem Lösungen von Gemischen in ihrer Wirkung gegeneinander ausgewogener Salze. Eine solche »ausbalancierte« Lösung stellt beispielsweise die bekannten Ringer'sche Lösung dar, aber auch die Nährlösungen, welche zur Kultur niedriger und höherer Pflanzen angewendet werden. (Die Natur bietet solche Lösungen vorbildlich im Meerwasser oder in der Blutflüssigkeit.)

Neuerdings gelangt man immer mehr zur Überzeugung, daß der Zustand der lipoidhaltigen »Grenzschichten« für das Wohl und Wehe der Zelle von besonderer Bedeutung sei. Eine Ansicht, die durch kolloidchemische Modellversuche über die antagonistische Ionenwirkung in Salzgemischen auf tierische und pflanzliche Phosphatide eine starke Stütze erfuhr, da diese überraschend gute Übereinstimmung mit Versuchen am lebenden Objekt (Eientwicklung usw.) ergaben: Bungenberg de Jong, H. Booy (1925), Neuschloß S. M. (1920).

Nehmen wir nun weiter an, daß die Giftwirkung der Schwermetalle darauf beruhe, daß sie mit den Eiweißkolloiden des Plasmas Verbindungen ergeben, die bei geringer Konzentration des Salzes noch im Solzustand verbleiben können, aber bei höheren zu irreversiblen, also letalen Flockungen Anlaß geben. Es hängt nun vom Zustand der den Stoffeintritt regelnden Plasmahautschichten ab, ob die Schwermetallverbindungen in die Zelle eindringen und dort ihren schädlichen Einfluß ausüben können. Während nun das Natrium der Nährlösung durch seine quellungsfördernde Wirkung das Eindringen erleichtert, kann möglicherweise das Calcium durch seine verfestigende Wirkung dem Eindringen entgegenwirken. Das Calcium scheint eine verhältnismäßig harmlose »Gerbung« — im Gegensatz zur irreversiblen Flockung durch Schwermetalle — zu bewirken, die den letztgenannten den Platz verlegt.

Es sei aber nochmals die Möglichkeit betont, daß unserem Deutungsversuch ein viel zu grobes Bild zugrunde liegt, das der tatsächlichen Vielfalt und Zartheit der Einflüsse und Strukturveränderungen nicht im entferntesten Rechnung trägt; sagt doch z. B. W. Benecke im 1. Band von Lafar's »Handbuch der technischen Mykologie« über Stimulation durch kleinste Giftmengen folgendes: »Man könnte geneigt sein, diese fördernde Wirkung kleinster Giftmengen als katalytischen Vorgang zu deuten Immerhin wäre

die Bezeichnung der Reizerscheinungen als Katalysen doch zu schematisch, da doch nicht ein einziger Prozeß, sondern der ganze Komplex von Lebenserscheinungen in einer nicht immer einheitlichen Weise beeinflußt wird.«

Ein neuer Ausblick auf das angeschnittene Gebiet über Metallsalzwirkungen auf biologische Vorgänge hat sich seit den Versuchen A. Smirnow's (1924, 1925) eröffnet, in denen der tiefgreifende Einfluß bestimmter Metalle, u. a. auch des Zinks, auf Fermentvorgänge (Peroxydase-Katalase-Wirkung) ermittelt wurde — und es wird ja allgemein angenommen, daß solche Enzymwirkungen beim biologischen Leuchten eine wesentliche Rolle spielen.

Wir legten uns nun die Frage vor, ob das Calcium in seiner »entgiftenden Wirkung« gegenüber Schwermetallsalzen durch die verwandten Metalle Strontium und Barium ersetzt werden könne.

Die Versuche wurden derart angestellt, daß neben der nur NaCl in der Nährlösung enthaltenden Reihe und der Reihe mit

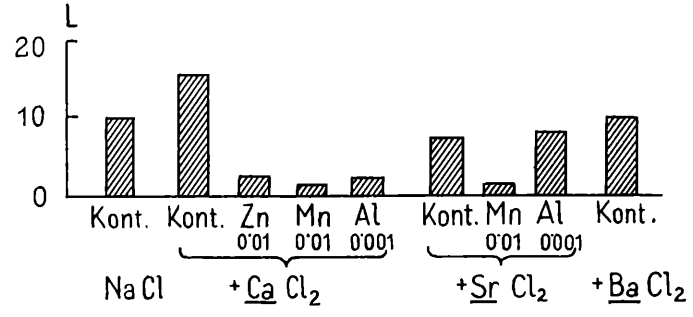

Fig. 6.

$CaCl_2$-Zusatz zwei weitere Versuchsreihen aufgestellt wurden, in denen zu 1·5% Kochsalz an Stelle des Calciumschlorids entsprechende Mengen (1·9%) $SrCl_2$ beziehungsweise $BaCl_2$ beigefügt wurden. Es wurden von vornherein nur solche Konzentrationen der Schwermetallsalze hinzugefügt, in denen in bloß kochsalzhaltiger Nährlösung keine Entwicklung zu erwarten war. Die erste derartige Versuchsreihe (8. bis 20. April 1936) ließ schon erkennen, daß die drei Erdalkalimetalle in ihrer Wirkung nicht gleichwertig waren; unerwarteterweise traf aber bei einigen Kontrollen, also in bloß NaCl-haltiger Nährlösung, in Gegenwart von 0·01% Mn und 0·001% Al schwaches Leuchten auf, so daß der Verdacht bestand, daß die zu den Zusätzen verwendeten Schwermetallsalzlösungen nicht mehr ganz einwandfrei waren. So wurden nach einer längerer Pause, die durch Befassung mit anderen Arbeiten verursacht worden war, die Versuche im Herbst wieder aufgenommen, und zwar mit frisch bereiteten Lösungen. Das Ergebnis findet sich in Tabelle 6 (siehe folgende Seite) und Fig. 6. Diese Figur gibt die relative Leuchtkraft der helleren Kulturen wieder, welche am dritten Tag nach der Beimpfung ermittelt wurde.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Tabelle 6.

(Vergleichende Versuche über die entgiftende Wirkung von Ca, Sr, Ba.)
(Beimpft 31. X. 1936 abends.)

Datum	3% NaCl					1·5% NaCl + 1·9% $CaCl_2$				
	Kontr.	Cu 0·025	Zn 0·01	Mn 0·01	Al 0·001	Kontr.	Cu 0·025	Zn 0·01	Mn 0·01	Al 0·001
		Prozent					Prozent			
2. XI.	+ +	—	—	+	—	+ +	—	+ —	+	+ —
3. XI.	+ +	—	—	+ —		+ +		+	+	+
4. XI.	+ +		—	—	—	+ +		+	+ —	+ —
5. XI.	+ +	—	—		—	+		+	+	+
6. XI.	+	—	—	—	—	+	—	+	+ —	+
7. XI.	+	—	—	—	—	+		+		+ —

Datum	1·5% NaCl + 1·9% $SrCl_2$					1·5% NaCl + 1·9% $BaCl_2$				
	Kontr.	Cu 0·025	Zn 0·01	Mn 0·01	Al 0·001	Kontr.	Cu 0·025	Zn 0·01	Mn 0·01	Al 0·001
		Prozent					Prozent			
2. XI.	+ +		—	+ —	+	+ +	—	—	—	—
3. XI.	+ +	—	—	+ —	+ +	+ +		—	—	+ —
4. XI.	+ +	—	+ —	+ —	+ +	+ +	—	—	—	+ —
5. XI.	+	—	—	+ —	+	+	—	—	—	+
6. XI.	+	—	—	+ —	+	+	—	—	—	—
8. XI.	+	—	—	+ —	+ —	+ —		—	—	—

Aus den Ergebnissen geht hervor, daß das Strontium das Calcium nicht vollends zu ersetzen vermag, z. B. bezüglich der Wirkung gegen 0·01% Zn, wo die Sr-haltige Nährlösung nur schwaches, rasch schwindendes Leuchten aufwies, während Ca-Gehalt bei derselben Konzentration noch dauerndes, recht gutes Leuchten ermöglichte. Anderseits scheint gerade $SrCl_2$ besonders gut geeignet, die Aluminiumhemmung zu kompensieren, was aus dem verhältnismäßig hohen Leuchtwert der Sr-haltigen Kultur mit Al-Zusatz hervorgeht. Was nun das Barium betrifft, muß gesagt werden, daß es bezüglich der »entgiftenden« Wirkung als Vertreter des Calciums am wenigsten geeignet erscheint; der einzige Unterschied gegenüber den Kontrollkulturen liegt in der Ermöglichung einer schwachen Entwicklung bei Al-Zusatz.

(Nebenbei sei nur bemerkt, daß die angewandte $CuSO_4$-Konzentration, 0·025%, durch keines der Erdalkalimetalle in seiner hemmenden Wirkung geschwächt wird, so daß wohl angenommen werden muß, daß die Erträglichkeitsschwelle für Kupfersulfat sehr nahe an 0·02% liegen muß.)

Die bezüglich Aluminium auffallend starke Gegenwirkung des Strontiums, welche die des Calciums weit übertraf, war der Gegenstand

weiterer Versuche, stellte sich aber immer wieder ein. So kann man eigentlich von einer Reihe absteigender Wirksamkeit: Calcium-Strontium-Barium, nicht im allgemeinen sprechen, sondern muß auf das Sonderverhalten der einzelnen Glieder im Verhältnis zu bestimmten Metallen, deren schädliche Salzwirkung sie ausgleichen sollen, Bedacht nehmen.

Auf dem Gebiet dieser speziellen antagonistischen Salzwirkungen ergibt sich sicher noch ein weites Feld zu weiteren Untersuchungen.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

Zu unseren Versuchen wurde ein Stamm mariner Leuchtbakterien, der von frischen Heringen abgezüchtet worden war, verwendet.

1. In Vorversuchen konnten einige bisher nicht angewendete Aminosäuren als günstige Stickstoffquellen zur Ernährung von Leuchtbakterien aufgezeigt werden, wie Glutaminsäure und Serin. Auch Alanin und Leuzin, welche in Gerretsen's Versuchen nur schwaches Leuchten ermöglichten, gaben gute Resultate.

2. Unter Verwendung von Glutaminsäure als salzfreier Stickstoffquelle konnten die Ergebnisse Richter's und Mudrak's über die Notwendigkeit des Na voll bestätigt werden; auch das Kalium scheint nach unseren Versuchen unbedingt lebenswichtig zu sein. Dagegen kann Calcium ohne nennenswerte Beeinträchtigung der Lichtentwicklung fortbleiben.

3. Zusätze von Schwermetall- sowie Zn- und Al-Salzen zur Nährlösung bedingen in höheren Konzentrationen Entwicklungshemmung, in bestimmten niedrigeren, jedoch mitunter — besonders bei Zn — deutliche Förderung.

Die Erträglichkeitsschwelle liegt für die verschiedenen Metalle verschieden hoch; auffallend hoch für das sonst als besonders giftig bekannte Kupfer. (Schwelle über $0{\cdot}02\%$ $CuSO_4$; es besteht aber die Möglichkeit, daß durch Komplexbindung an organischen Komponenten in der Nährlösung die Giftigkeit herabgesetzt wird.)

4. Mit Hilfe einer eigens konstruierten Meßanordnung, die eine Parallelbestimmung von relativer Leuchtkraft und Keimdichte der Kulturen ermöglichte, ließ sich zeigen, daß die durch stimulierende Salzzusätze erhöhte Lichtentwicklung der Bakterien nicht auf gesteigerter Vermehrung, sondern auf Steigerung der Lichtproduktion der Einzelzelle beruht.

5. Die Gegenwart von $CaCl_2$ in der Nährlösung vermag der Giftwirkung der Schwermetalle weitgehend entgegenzuwirken und gibt auch zu einem Schwinden, beziehungsweise einer Verschiebung der Stimulationswirkungen Anlaß.

6. In dieser antagonistischen Wirkung gegenüber Schwermetallsalzen kann das Calcium teilweise durch Strontium, am wenigsten aber durch Barium vertreten werden. Von einer allgemeingültigen

Reihung der Erdalkalimetalle in dieser Hinsicht kann jedoch nicht gesprochen werden, da sich in bestimmten Fällen Ausnahmen ergeben: So wirkt dem hemmenden Einfluß von Aluminiumsalzen die Anwesenheit von Strontium besonders deutlich entgegen.

Die Durchführung dieser Arbeit wurde durch ein Stipendium der Akademie der Wissenschaften in Wien ermöglicht, wofür ich an dieser Stelle meinem ergebenen Dank Ausdruck geben möchte. Zu großem Dank bin ich auch Herrn Hofrat Prof. Dr. Hans Molisch verpflichtet, für seine Anteilnahme in Rat und Tat. Die Versuche wurden am Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien im Frühjahr und Herbst 1936 ausgeführt, was vom Leiter des Institutes, Herrn Prof. Dr. K. Höfler, in dankenswerter Weise gestattet wurde.

Verzeichnis der angeführten Schriften.

Bechhold H. (1920), Kolloide in Biologie und Medizin (daraus zit. Loeb, Mathews).

Beijerinck M. W. (1890), Mededeel. d. K. Akad. van Wetenschappen, af deel Natuurkunde, VII.

Bertrand (1911), Comptes rend., *152*.

Bungenberg de Jong-H. Booy (1935), Protoplasma, *24*.

Fuhrmann F. (1932), Studien zur Biologie der Leuchtbakterien, I, II (Monatsh. f. Chem., *60*).

Gerretsen F. C. (1920), Bakt. Zentralbl., II, 52.

Kostyschew S. (1926), Lehrbuch der Pflanzenphysiologie, I (Springer, Berlin).

Lafar F., Handbuch der techn. Mykologie (Fischer, Jena).

Molisch H. (1892), Die Pflanzen in ihren Beziehungen zum Eisen (Fischer, Jena).

— (1895), Sitzungsber. d. Akad d. Wiss. in Wien, math.-naturw. Kl., I, *104*.

— (1896), I, *105*.

— (1912), Leuchtende Pflanzen, 2. Aufl. (Fischer, Jena).

Mudrak A. (1933), Bakt. Zentralbl., II, 88.

Neuschloß S. M. (1920), Pflüg. Archiv f. d. Ges. d. Physiol., *181*.

Ono (1900), Journ. coll. sci. Imp. Univ. Tokyo, *13*.

Raulin (1869), Ann. d. sciences nat., *5*, 2.

Richter O. (1928), Denkschr. d. Akad. d. Wiss. in Wien, math.-naturw. Kl., *101*.

Smirnow A. (1924/25), Biochem. Zeitschrift.